

PTO 2003-3246

S.T.I.C. Translations Branch

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-103653

(43) 公開日 平成8年(1996)4月23日

(51) IntCl. <sup>6</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
B 0 1 J 20/26		H		
G 0 1 N 30/48		R		
// A 6 1 M 1/36	5 4 5			
G 0 1 N 33/566				

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平6-238677

(22) 出願日 平成6年(1994)10月3日

(71) 出願人 000109543

テルモ株式会社

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番1号

(72) 発明者 大西 誠人

神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地

テルモ株式会社内

(54) 【発明の名称】 刺激応答型分離材料及びその製造方法

(57) 【要約】

【目的】 標的物質に対する高い特異性を有し細胞を簡便に回収できる分離材料及び分離システムを提供することを目的とする。

【構成】 標的物質に対して親和性を有する領域と刺激応答性高分子鎖よりなる領域とを表面に有する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】標的物質に対して親和性を有する領域と刺激応答性高分子鎖よりなる領域とを表面に有する刺激応答型分離材料。

【請求項2】標的物質に対して親和性を有する分子鎖と刺激応答性領域よりなる分子鎖とを有するブロック共重合体もしくはグラフト共重合体を主成分として構成された表面を有する請求項1の刺激応答型分離材料。

【請求項3】刺激応答性領域よりなる分子鎖と反応性官能基を有する分子鎖とを有するブロック共重合体もしくはグラフト共重合体を主成分とする表面を形成させた後、標的物質に対して親和性を有する物質を該共重合体の反応性官能基に固定化することを特徴とする刺激応答性分離材料の製造方法。

【請求項4】刺激応答性領域よりなる分子鎖と反応性官能基を有する分子鎖とを有するブロック共重合体もしくはグラフト共重合体に、標的物質に対して親和性を有する物質を該共重合体の反応性官能基に結合させた後、基材表面上に保持させることを特徴とする刺激応答性分離材料の製造方法。

【請求項5】刺激応答性領域よりなる分子鎖と反応性官能基を有する分子鎖とを有するブロック共重合体もしくはグラフト共重合体と、標的物質に対して親和性を有する物質とを含む溶液を基材表面上に塗布した後、お互いを反応させることを特徴とする刺激応答性分離材料の製造方法。

【請求項6】標的物質に対して親和性を有する領域と刺激応答性高分子鎖よりなる領域とを表面に有する刺激応答型分離材料を用いて、標的物質を該分離材料に結合させた後、刺激応答性高分子鎖の高次構造を変化させることにより、標的物質を該分離材料より脱離させることを特徴とする物質の分離精製方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、標的物質に対して特異的親和性を有する物質と刺激応答性高分子とを利用した新規な分離材料及び分離方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】近年、細胞工学や遺伝子工学等の発展に伴い、細胞や遺伝子を利用した細胞治療や遺伝子治療の研究が盛んとなっており、目的とした細胞や生体物質を損傷させることなく分離する技術が重要となっている。また、バイオテクノロジーの発展により、生物工学的手法によるペプチド、蛋白質、糖蛋白質質といった生理活性分子の生産が行われるようになってきており、細胞やバイオプロダクツの簡便で損傷の少ない分離精製技術が望まれている。

【0003】従来より化学工業分野で使用されている吸着・分配・蒸留・析出といった分離・精製の単位操作では、熱や有機溶媒の添加などにより、被精製物質に対し

て大幅な環境変化を強いるため、前述の細胞やバイオプロダクツの分離には適していないことが多い。

【0004】細胞やバイオプロダクツの分離方法として、体積（分子量）や密度による方法（沈降速度法、密度勾配遠心法、ゲル濾過法など）、電場中での移動度の差による方法（電気泳動など）、等電点による方法（焦点電気泳動など）、2液相間への分配による方法（2層分配法、分配クロマトグラフィー）、固相への吸着性の差による方法（吸着クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー）などが知られている。

【0005】これらの分離方法の多くは、物理化学的性状が大きく異なる細胞成分の分離には適用できるものの、物理化学的性状が良く似た成分や細胞、例えばリンパ球亜集団の分離などには適用が困難であった。この中で標的物質に対する選択性の高い方法は、アフィニティークロマトグラフィーであり、近年広く利用されるようになってきている。細胞を対象とするアフィニティークロマトグラフィーとしては、標的細胞の表層に存在する膜蛋白等に対するモノクローナル抗体を結合したビーズやシャーレを用いた分離方法が報告されており、本方法による各種リンパ球の亜集団分離も報告されている。（例えば、ジャーナル・オブ・イミュノロジカル・メソッド、第54号、251ページ、1983年に記載されているブラウンらの研究報告）この抗体を用いた方法は、特異性が極めて高いことで利点であるが、欠点として、吸着した細胞の脱着が困難なこと、抗体が細胞表層の抗原に結合するための時間（接触時間）を長くする必要があり、その結果、非特異的な吸着が増加することなどがあった。

【0006】前述の欠点を改良した方法としては、アビジン-ビオチンのような親和性の高い結合を利用して、短時間で分離材料に吸着させる方法がWO91/16116で提案されている。にすなわち、ビオチンで標識した抗体を予め時間をかけて標的細胞に結合させた後、アビジンを結合した分離材料に吸着させることにより、短時間で効率良く標的細胞を分離できることとなる。しかしながら、この方法では、物理的振動を用いて抗体と標的細胞の結合やアビジンとビオチンとの結合を解離することにより標的細胞の回収が行われているため、ビーズ同士の衝突等による細胞の損傷や機能低下が免れない。

【0007】細胞機能を損なわないように回収する方法としては、特開平2-211865に記載された水に対する上限または下限臨界溶解温度が0～80℃にあるポリマーもしくはコポリマーで表面を被覆した細胞培養基材が報告されている。この方法は、温度により疎水性-親水性と相転移する温度応答性高分子を利用したものであり、温度応答性高分子が疎水性で収縮した状態の時に細胞を吸着させた後、温度を変化させ、親水性となって膨潤するときに吸着した細胞を脱着させる方法である。この方法の欠点は、細胞に対する特異性が低いため、種

10

20

30

40

50

3

々の細胞が存在する液体から特定の細胞を回収することができないことである。特に、マクロファージ、白血球、リンパ球などの多くは、曲率の小さい表面に吸着することが知られており、フィルターや不織布形状に加工したこの分離材料を用いて、特定のリンパ球などを選択的に回収することは不可能であった。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明は、標的物質に対する高い特異性を有し細胞を簡便に回収できる分離材料及び分離システムを提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】上記発明の目的は以下の刺激応答型分離材料及びその製造方法によって達成される。

(1) 標的物質に対して親和性を有する領域と刺激応答性高分子鎖よりなる領域とを表面に有する刺激応答型分離材料。

(2) 標的物質に対して親和性を有する分子鎖と刺激応答性領域よりなる分子鎖とを有するブロック共重合体もしくはグラフト共重合体を主成分として構成された表面を有する(1)の刺激応答型分離材料。

(3) 刺激応答性領域よりなる分子鎖と反応性官能基を有する分子鎖とを有するブロック共重合体もしくはグラフト共重合体を主成分とする表面を形成させた後、標的物質に対して親和性を有する物質を該共重合体の反応性官能基に固定化することを特徴とする刺激応答性分離材料の製造方法。

(4) 刺激応答性領域よりなる分子鎖と反応性官能基を有する分子鎖とを有するブロック共重合体もしくはグラフト共重合体に、標的物質に対して親和性を有する物質を該共重合体の反応性官能基に結合させた後、基材表面上に保持させることを特徴とする刺激応答性分離材料の製造方法。

(5) 刺激応答性領域よりなる分子鎖と反応性官能基を有する分子鎖とを有するブロック共重合体もしくはグラフト共重合体と、標的物質に対して親和性を有する物質とを含む溶液を基材表面上に塗布した後、お互いを反応させることを特徴とする刺激応答性分離材料の製造方法。

(6) 標的物質に対して親和性を有する領域と刺激応答性高分子鎖よりなる領域とを表面に有する刺激応答型分離材料を用いて、標的物質を該分離材料に結合させた後、刺激応答性高分子鎖の高次構造を変化させることにより、標的物質を該分離材料より脱離させることを特徴とする物質の分離精製方法。

【0010】本発明においては、標的物質は特に限定されず、蛋白質、糖蛋白質、核酸、細胞、人工細胞、合成高分子化合物などを例示できる。本発明の分離材料は、標的物質に対して親和性を有する領域と刺激応答性高分子鎖よりなる領域とを表面に有する材料であり、表面が相分離していることが特徴である。従って、標的物質に対して親和性を有する分子(リガンド)が、相分離構造に従ってミクロ的に不均一に存在することが特徴となるが、その際、標的物質の大きさが該標的物質に対して親和性を有する領域の大きさより小さいことが好ましい。相分離構造を形成させる方法としては、ブロックもしくはグラフト共重合体を用いる方法が好ましい。高分子間で相溶性を示すものもあるが、多くの高分子は相分離を起こすことが知られている。特に、ブロックもしくはグラフト共重合体は、海島状、縞状、ラメラ状に規則的なミクロ相分離構造を発現することが知られているおり、このような構造が本発明の分離材料としては好ましい。表面における標的物質の親和性領域の比率は、外部環境により異なるため明確に規定できないが、標的物質を吸着する時に、10~90%、好ましくは、20~80%である。

4

【0011】標的物質としては、サイズが大きい「細胞」を好適に例示できる。また、細胞を標的とした場合、該細胞に対して親和性を有する分子(リガンド)が、相分離構造に従ってミクロ的に不均一に存在しているため、細胞が分離材料表面に吸着されるときにしばしば観察されるキャッピング現象が回避されソフトに吸着することとなる。そのため、細胞の損傷が少なくなり、吸着した細胞の機能を発現させる場合や分離精製(回収)する場合に、優れた性能を発現することとなる。標的とする細胞は限定されず、例えば、上皮系細胞、肝実質細胞、脾ラ島細胞、マクロファージ、単核球、NK細胞(CD56<sup>+</sup>)、血液幹細胞などの未分化細胞(CD34<sup>+</sup>)、Bリンパ球、Tリンパ球、及びそのサブセット(CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD19<sup>+</sup>、CD71<sup>+</sup>、IL2R<sup>+</sup>など)、各種の腫瘍細胞や機能細胞等より、目的に応じて選定される。

【0012】刺激応答性高分子とは、熱、PH、電位、光などにより高次構造が変化して、水溶液中で膨潤したり収縮する高分子であればよい。例えば、水に対する上限臨界温度または下限臨界温度を有し、温度変化に応答して、膨潤-収縮する高分子を好適に例示できる。そのような高分子としては、N-イソプロピルアクリルアミドやN、N-ジエチルアクリルアミド、N-イソプロピルメタアクリルアミドなどのアクリルアミドやメタアクリルアミドの誘導体類をはじめ、ビニルメチルエーテルなどのビニルエーテル類などのポリマーやコポリマーを例示できる。また、光により構造変化させる場合は、例えば、アゾベンゼン基を有する吸水性高分子のように光異性化をおこす高分子、トリフェニルメタンロイコハイドロオキシドのビニル誘導体とアクリルアミド系単量体との共重合体のように光イオン解離する感応基を有する温度応答性高分子、スピロベンゾピランを含むN-イソプロピルアクリルアミドゲルのように疎水性相互作用

10

20

30

40

50

が光変化する温度応答性高分子などを用いることができる。

【0013】電気化学的に構造変化を生じさせるには、ビニルフェロセンとイソプロピルアクリルアミド共重合体のようにフェロセニル基を側鎖に有する温度応答性高分子を例示することができる。フェロセニル基は、還元状態では疎水性の官能基であるが、酸化されると親水性が高まるため、一定の温度領域で電気化学的に膨潤～収縮を制御することができる。

【0014】電気や光により制御できる温度領域は、アルキルアクリルアミドのような温度応答性高分子を形成するモノマーに親水性モノマーや疎水性モノマーを少量共重合させることにより、任意に制御することが可能である。たとえば、疎水性モノマーを共重合させると相転移温度は低くなり、親水性モノマーを共重合させると相転移温度は高くなる。

【0015】イオンにより構造変化を誘導したり加速するためには、イオン解離する官能基を有するモノマーを共重合したり、イオンを捕捉する分子を側鎖に導入させてやればよい。例えば、ナトリウムやカリウムを認識するクラウンエーテル（ベンゾ[18]クラウン-6）を側鎖にポリイソプロピルアクリルアミドは、ナトリウムイオンやカリウムイオンにより相転移が引き起こされる。

【0016】標的物質に対して親和性を有する領域には、抗原-抗体、酵素-基質（阻害剤）、各種の生理活性物質とそのレセプターとの反応などの生体の制御機構で見られる特異的親和性により標的物質を吸着するリガンドや、静電相互作用、疎水性相互作用、水素結合、ファンデルワールス相互作用等によって標的物質に対して親和性を示す合成化合物やそれらの相互作用を効果的に発現できるよう人工的に設計された分子認識素子などが存在する。

【0017】標的物質に対して親和性を有する領域は、刺激応答性高分子鎖と必ずしも化学的に結合していなくてもよく、ブレンド法や積層法を利用して相分離構造を形成させてもよい。また、金属、セラミック、あるいは有機物よりなる直径5 $\mu$ 以下、好ましくは2 $\mu$ 以下の微粉体などを利用して不均一構造を形成させ、該微粉体上に標的細胞に対して親和性を有する物質を結合させることも可能である。

【0018】リガンドの反応性官能基への固定化は、公知の化学反応を用いた方法で達成できるが、両者の結合の間に、スペーサーや2種以上の化合物よりなる結合が存在していてもよい。結合様式としては、生理的条件下で容易に脱離しないことが望ましいが、必ずしも共有結合である必要はなく、イオンコンプレックスや電荷移動錯体などを利用した結合でもかまわない。また、生理的条件下で高い親和性を有するビオチン-アビジン、ビオチン-ストレプトアビジン、リボフラビン-リボフラビン結合蛋白、プロテインA-IgG、プロテインG-IgG

などの生化学的親和性を利用した結合であってもよい。ビオチン-アビジンの組み合わせは、ビオチン標識抗体などが市販されており容易に入手できるため、標的物質に対する抗体をアビジンを介して反応性官能基に固定化することができる。

【0019】反応性官能基とは、標的物質に対して親和性を有するリガンドを結合できる官能基であれば良く、カルボキシル基、アルデヒド基、アミノ基、イミノ基、スルホン酸基、エポキシ基、イソシアネート基、酸クロリド基、ヒドロキシ基、チオール基、ジスルフィド基などの官能基を例示できる。また、カルボニルジイミダゾール、トシル、トレシルなどで活性化されていてもかまわない。これらの官能基を利用して、直接あるいは縮合剤や架橋剤を用いて、標的物質に対するリガンドを結合することが可能である。反応性官能基がエポキシ基のように、直接アミノ基やカルボキシル基と反応するタイプであると反応操作が簡略化できるため好ましい。ヒドロキシ基のように反応性の低い官能基の場合、両末端に反応性の高い官能基を有する架橋剤、例えばポリイソシアネート類、ポリエポキシ化合物、ジアルデヒド化合物などを利用してリガンドを固定化することも可能である。

【0020】反応性官能基を有する分子鎖を形成させる方法は、公知の方法でかまわない。例えば、官能基を有する単量体を重合したり、他の単量体と共重合することにより反応性官能基を有する分子鎖を形成させる方法や、すでに形成された分子鎖を化学修飾することにより反応性の高い官能基を導入する方法などを例示できる。分離材料の形態は、特に限定されず、プレート状、シャーレ状、繊維状、不織布状、多孔質膜、多孔質フィルター、ビーズなどを例示でき、それぞれの形態にあったカラムなりモジュールに収納されて使用されてもかまわない。また、その基材となる材質についても水に対して非溶解性であれば特に限定されず、ポリオレフィン、ハロゲン化ポリオレフィン、ポリウレタン、ポリアミド、ポリエステル、綿、ポリスチレン、及びそれらの変性物や共重合体など、既存の材料を例示することができる。

【0021】分離材料に吸着した標的物質の回収は、温度、光、電気等の刺激により刺激応答性高分子の高次構造を急速に変化せしめることにより行う。例えば、刺激応答性領域が収縮した条件下でリガンドが表面に存在する分離材料の場合、この状態で標的物質を吸着させた後、外部刺激により刺激応答性領域を膨潤させることにより、その急激な環境変化を利用して標的物質が材料表面より脱着することとなる。脱着させた場合の回収率は、固定化したリガンドの種類や状態、刺激応答領域と吸着領域の構造や組成比により異なり、使用条件に応じた条件設定が必要となるが、50%以上、好ましくは80%以上である。

【0022】標的物質と刺激応答性高分子の間に弱い結合が存在する場合、その結合を解離することによって標

10

20

30

40

50

的物質を脱離させてもかまわない。回収率の向上などを目的として、必要に応じて物理的な方法や化学的な方法を併用してもかまわない。

【0023】

【実施例】

(実施例1) 標的物質としてCD4<sup>+</sup>細胞を設定し、標的物質に対して特異的親和性を有する物質としてCD4に対する抗体、刺激応答性高分子としてポリ(N-ジエチルアクリルアミド)を用いて分離用吸着材料を作製し、CD4<sup>+</sup>細胞の分離を検討した。

【0024】主鎖にアゾ基を有するポリグリシジルメタクリレートと共重合体(1:1)を重合開始剤として、N,N-ジエチルアクリルアミドをジメチルスルホキシド中で80℃、16時間重合し、石油エーテル中で再沈殿させた後、ポリマーを減圧乾燥させることにより、刺激応答性ドメインとしてポリ(N,N-ジエチルアクリルアミド)、反応性ドメインとしてポリ(グリシジルメタクリレート)を有するブロックコポリマー(モル組成比3:1)を得た。

【0025】このブロック共重合体の3%ジオキサン溶液を、厚さ100μmのポリウレタンシートにコーティングした。続いて、0.01wt%のポリエチレンイミン(平均分子量1200)を含むCD4抗体の5mg/ml溶液をコーティングした後、38℃で16時間反応させることにより、刺激応答型分離材料を得た。

【0026】この材料に、人新鮮血バフィーコートより1%アルブミン添加PBSで洗浄して調整した白血球液(1×10<sup>6</sup>/ml)を37℃で接触させることにより、CD4<sup>+</sup>細胞を吸着させた。位相差顕微鏡を用いて、吸着細胞の脱着を観察したところ、1%アルブミンを添加したPBSで25℃でリンスすることにより脱着できることを確認した。

【0027】(実施例2) 1.0%のポリメタクリル酸を溶解させたDMSO溶液と、実施例1で作製したブロックコポリマーの4%DMSO溶液を1:1で混合した後、ポリメタクリル酸を表面グラフト重合したポリエチレンシートにコーティングした後、60℃40時間反応させた。続いて、5mg/mlの1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(シグマ社製)溶液を20ml(pH5.5)シャーレに注入し、5分間室温で浸漬させた。続いて、CD4抗体の5mg/ml溶液と接触させて室温で1時間時々攪拌しながら反応させた後、グリシンを最終濃度で0.2モルとなるように添加して1時間放置した後、リン酸バッファー(PBS)でリンスすることによりCD4<sup>+</sup>細胞分離材料を作

製した。

【0028】この材料に、人新鮮血バフィーコートより1%アルブミン添加PBSで洗浄して調整した白血球液(1×10<sup>6</sup>/ml)を37℃で接触させることにより、CD4<sup>+</sup>細胞を吸着させた。位相差顕微鏡を用いて、吸着細胞の脱着を観察したところ、1%アルブミンを添加したPBSで25℃でリンスすることにより脱着できることを確認した。

【0029】(実施例3) 主鎖にパーオキサイド基を有するポリグリシジルメタクリレートとメチルアクリレートとの共重合体(1:1)を重合開始剤として、N-イソプロピルアクリルアミドをジメチルスルホキシド中で80℃、16時間重合して、刺激応答性ドメインとしてポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)、反応性ドメインとしてポリ(グリシジルメタクリレート-メチルアクリレート共重合体)を有するブロックコポリマー(モル組成比4.8:1)を得た。

【0030】0.5wt%のCD4抗体を含む20%DMSO溶液に上記ポリマー2wt%を含む60%DMSO溶液を1:1で混合した後、ポリメタクリル酸を表面グラフト重合したポリエチレンシートにコーティングし、60℃40時間反応させた。この材料に、人新鮮血バフィーコートより1%アルブミン添加PBSで洗浄して調整した白血球液(1×10<sup>6</sup>/ml)を37℃で接触させることにより、CD4<sup>+</sup>細胞を吸着させた。位相差顕微鏡を用いて、吸着細胞の脱着を観察したところ、1%アルブミンを添加したPBSで25℃でリンスすることにより脱着できることを確認した。

【0031】

【発明の効果】本発明の分離材料や分離方法は、刺激応答領域と標的物質に対する親和性領域とが存在する。従って、刺激応答領域における体積変化が大きくなり吸着物質の脱着が起こりやすくなる。また、相分離構造を形成させることにより、標的細胞が吸着した場合のキャッピング現象を抑制することができるため、機能損傷の少ない高品質の細胞を回収できることとなる。その結果、従来困難であった血球系細胞や機能細胞の分離精製が簡便にできるようになり、本発明の分離材料や技術は、標的細胞の分離、増殖、機能変換等を利用したバイオプロダクツの生産や細胞治療、遺伝子治療、診断等に効果を発揮することとなる。また、本発明は、医療分野のみならず各種の産業分野において新しい分離技術として効果を発現することとなる。